

核桃举肢蛾性信息素结合蛋白 2 的分子克隆和免疫荧光定位

李文海, 黄兴龙, 王 敦, 冯纪年*

(西北农林科技大学, 植保资源与病虫害治理教育部重点实验室, 陕西杨凌 712100)

摘要:【目的】明确核桃举肢蛾 *Atrijuglans hetaohei* Yang 性信息素结合蛋白 2 (AhetPBP2) 在核桃举肢蛾触角中的分布。【方法】本研究提取羽化后 3–4 d 的核桃举肢蛾成虫触角总 RNA 并反转录合成 cDNA, 设计简并引物进行 RT-PCR 获得 cDNA 片段, 然后利用 RACE 技术获得 *AhetPBP2* 全长 cDNA 序列。将去除信号肽序列的 *AhetPBP2* 进行原核表达, 重组蛋白经镍柱纯化并免疫新西兰大白兔制备多克隆抗体。制备的多克隆抗体作为一抗对核桃举肢蛾触角进行免疫组化分析。【结果】*AhetPBP2* 基因 cDNA 序列全长 923 bp, 开放阅读框 504 bp, 共编码 167 个氨基酸, 分子量为 19.26 kD, 等电点为 5.47。1 mmol/L IPTG 诱导 10 h 获得可溶性重组蛋白, Western blot 结果表明重组蛋白诱导表达成功, ELISA 检测显示抗体效价为 1:1 024 000。免疫荧光定位结果显示核桃举肢蛾成虫触角部分感器被 AhetPBP2 抗体标记。【结论】核桃举肢蛾成虫触角的部分感器中可能存在 AhetPBP2, 推测该部分感器具有感受性信息素的功能。

关键词: 核桃举肢蛾; 性信息素结合蛋白; 原核表达; 多克隆抗体; 免疫荧光定位

中图分类号: Q966 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2015)10-1054-09

Molecular cloning and immunofluorescence localization of sex pheromone binding protein 2 from *Atrijuglans hetaohei* (Lepidoptera: Heliodinidae)

LI Wen-Hai, HUANG Xing-Long, WANG Dun, FENG Ji-Nian* (Key Laboratory of Plant Protection Resources & Pest Management of Ministry of Education, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: 【Aim】The objective of this study is to analyze the distribution of AhetPBP2 in the antenna of *Atrijuglans hetaohei*. 【Methods】The cDNA was synthesized with the total RNA extracted from antennae of newly emerged adults of *A. hetaohei*. The cDNA segment of *AhetPBP2* was amplified by RT-PCR with degenerate primers. The full-length cDNA sequence of *AhetPBP2* was obtained by RACE. *AhetPBP2* without the signal peptide sequence was expressed in *Escherichia coli* BL21 (DE3). Recombinant AhetPBP2 was purified through Ni-chelating affinity chromatography. The polyclonal antiserum was prepared by immunizing a male New Zealand white rabbit with the purified AhetPBP2. Immunohistochemical analysis was performed with the polyclonal antibody of AhetPBP2. 【Results】The full-length cDNA sequence of *AhetPBP2* is 923 bp. Its open reading frame is 504 bp, encoding a protein of 167 amino acids with the molecular weight of 19.26 kD and the isoelectric point of 5.47. After induction with 1 mmol/L IPTG for 10 h, the soluble recombinant protein AhetPBP2 was obtained. Western blot showed that the recombinant protein was expressed successfully. ELISA detection showed that the titer for the polyclonal antibody was 1:1 024 000. Immunohistochemical analysis showed that parts of the antennal sensilla were labeled by AhetPBP2 polyclonal antibody. 【Conclusion】AhetPBP2 is localized on parts of antennal sensilla of *A. hetaohei* adults, suggesting that these antennal sensilla may be involved in the perception of sex pheromones.

Key words: *Atrijuglans hetaohei*; sex pheromone binding protein; prokaryotic expression; polyclonal antibody; immunofluorescence localization

基金项目: 陕西省科技统筹项目 (2012KTZB02-01-02)

作者简介: 李文海, 男, 1988 年生, 陕西西安人, 硕士研究生, 研究方向为农业昆虫与害虫防治, E-mail: wenhai@nwsuaf.edu.cn

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: jinnanf@nwsuaf.edu.cn

收稿日期 Received: 2015-03-31; 接受日期 Accepted: 2015-08-04

核桃举肢蛾 *Atrijuglans hetaohei* Yang 是危害核桃的主要害虫之一, 普遍存在于我国各核桃产区, 其幼虫蛀食核桃青皮及幼果果肉, 致使核桃腐烂大量减产。目前, 对核桃举肢蛾仍未有一个高效经济且对环境影响较小的防治策略。利用昆虫依靠性信息素寻找配偶的特点, 人工合成性诱剂用于有害昆虫的诱捕和交配干扰可以取得良好的防治效果 (Schneider, 1992; Hansson, 1995; 杜娟等, 2013)。性信息素结合蛋白 (pheromone binding proteins, PBP) 属于气味结合蛋白 (odorant binding proteins, OBPs) 多基因家族的一个分支 (修伟明等, 2005), 普通气味结合蛋白 (general odorant binding proteins, GOBPs) 主要在感受普通气味的锥形感器中表达, 而 PBP 主要在感受性信息素的毛形感器中表达 (Steinbrecht *et al.*, 1992; Steinbrecht *et al.*, 1995; Vogt *et al.*, 2002)。PBP 通常由 140 个左右的氨基酸残基组成, 分子量较小, 序列中 6 个保守的半胱氨酸残基形成 3 个二硫键 (C1-C3, C2-C5 和 C4-C6) (Leal *et al.*, 1999; Briand *et al.*, 2001)。PBP 能够结合雌虫释放的性信息素, 携带亲脂性的性信息素分子穿过血淋巴, 到达嗅觉神经元树突表面, 由气味受体对性信息素进行识别 (Vogt *et al.*, 1999)。

Vogt 和 Riddiford (1981) 在多音大蚕蛾 *Antheraea polyphemus* 雄蛾触角中首次发现性信息素结合蛋白, 此后越来越多的昆虫 PBP 被发现, 相关研究不断深入。而关于核桃举肢蛾性信息素通讯系统的研究仍停留在对雄虫触角及雌虫性腺的扫描电镜观察上, 对性信息素结合蛋白的研究尚为空白, 性信息素有效成分的鉴定也未有明确结论 (郝兴宇等, 2005, 2007, 2008)。有鉴于此, 本文选取核桃举肢蛾性信息素结合蛋白作为研究对象, 为深入研究核桃举肢蛾性信息素通讯系统奠定基础, 也为利用性信息素对核桃举肢蛾成虫进行生物防治提供理论依据。

本研究利用简并引物进行 RT-PCR, 得到 *AhetPBP2* 的 cDNA 片段, 然后通过 RACE 技术获得 *AhetPBP2* 全长 cDNA 序列。为明确 *AhetPBP2* 在触角中的分布, 我们制备了 *AhetPBP2* 蛋白多克隆抗体, 用于核桃举肢蛾触角免疫组化分析, 结果表明核桃举肢蛾成虫触角上部分感器被抗体标记, 推测该部分感器具有感受性信息素的功能。

1 材料与方法

1.1 供试虫源

于 2013 年 2 月份从商洛市山阳县核桃园内土壤中筛选核桃举肢蛾老熟幼虫, 将其置于气候箱内,

光周期为 16L: 8D, 温度控制在 25℃, 相对湿度为 75%, 取羽化后 3–4 d 的成虫, 切下触角 (100 对), 于 -80℃ 保存备用。

1.2 主要试剂

RNAiso Plus Kit、pMD19-T 克隆载体、Taq DNA 聚合酶、DNA marker 和蛋白质 marker 均购自大连宝生物公司, RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit 购自赛默飞世尔公司, IPTG 和 Amp 购自北京百瑞金公司, pEASY-E1 Expression Kit、ProteinIso Ni-NTA Resin 和 Affinity Chromatographic Column 购自全式金公司, DNA 胶回收试剂盒购自 Zymo 公司, HRP-山羊抗兔 IgG (H + L) 购自先锋公司, eECL Western Blot Kit 购自康为世纪公司, HRP-conjugated 6 * His-tag Monoclonal Antibody 和 Alexa Fluor 488-conjugated Affinipure Goat Anti-Rabbit IgG (H + L) 购自 Proteintech 公司。

1.3 触角总 RNA 的提取和 cDNA 的合成

用 RNA 提取试剂 (RNAiso Plus Kit, TaKaRa) 提取核桃举肢蛾触角总 RNA, 每组触角用量为 50 对左右, 分为两组, 并用反转录试剂盒 (RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit, Thermo Scientific) 合成 cDNA, 操作步骤参照说明书。

1.4 引物的设计与合成

扩增 *AhetPBP2* 基因的 cDNA 片段引物根据苹果巢蛾 *Yponomeuta cagnagellus* 性信息素结合蛋白 YcagPBP (AAF06143)、苹果银蛾 *Argyresthia conjugella* 性信息素结合蛋白 AconPBP1 (AFD34176) 和小菜蛾 *Plutella xylostella* 性信息素结合蛋白 PxylPBP2 (AGH13203) 氨基酸序列比对获得的保守区设计, 并根据获得的 cDNA 片段设计 RACE 引物。对 RACE 测序结果进行拼接, 设计 *AhetPBP2* 基因开放阅读框全长引物。通过 SignalP 软件预测 *AhetPBP2* 蛋白的信号肽部分, 并针对去除信号肽后的序列设计引物, 用于表达载体的构建。试验所涉及的引物序列见表 1。

1.5 核桃举肢蛾 *PBP2* 全长 cDNA 序列的获得及序列分析

根据 NCBI 已发表的鳞翅目昆虫 PBP 氨基酸序列保守区设计简并引物, 以 cDNA 为模板, 以 PF1 和 PR1 为引物进行扩增。PCR 反应体系: 10 × PCR Buffer (Mg²⁺ free) 2.5 μL, MgCl₂ (25 mmol/L) 2 μL, dNTP Mix (各 2.5 mmol/L) 2 μL, 上游引物 PF1 (10 μmol/L) 1 μL, 下游引物 PR2 (10 μmol/L) 1 μL, cDNA 模板适量, Taq 酶 (5 U/μL) 0.2 μL, dd H₂O

表 1 试验所用引物
Table 1 Primers for experiments

引物名称 Primer name	引物序列(5′–3′) Primer sequence	引物用途 Purpose
PF1 PR1	GAYTTYTAYAAYYTTYTGGMGNGA ACYTCCATNSWNGGNGCCCAYYT	扩增 <i>AhetPBP2</i> cDNA 片段的简并引物 Degenerate primers for amplification of cDNA fragment of <i>AhetPBP2</i>
AhGSP1 LUPM	AAGGTTACGAAGGAATCCAGGACGACT CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	3′RACE
AhGSP2 AUPL	TCGTCCTGGATTCTTCTCGTGAACCTTCT AAGCACTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGGGGGGGGG	5′RACE
AhPBPF AhPBPR	ATGGCGGCGAGTTCAAAATGGCGGG TTACTGTATCTCCGTCATCACTTCT	扩增 <i>AhetPBP2</i> 全长的特异性引物 Specific primers for amplification of full-length cDNA sequence of <i>AhetPBP2</i>
AhPBPF2 AhPBPR2	TCGCAGGAGATAATGAAGAAGTTGA TTACTGTATCTCCGTCATCACTTCT	扩增 <i>AhetPBP2</i> 的特异性引物(去信号肽序列) Specific primers for amplification of <i>AhetPBP2</i> cDNA sequence without the signal peptide sequence

补足至 25 μL。PCR 扩增条件:94℃ 预变性 4 min; 94℃ 40 s, 55℃ 1 min, 72℃ 1 min, 37 个循环; 72℃ 延伸 10 min。PCR 产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测,切胶回收目的片段连接 pMD-19T 克隆载体,并转化于 TG1 感受态细胞中,挑选阳性克隆菌于含氨苄的 LB 液体培养基中 37℃ 200 r/min 过夜培养,将菌液送上海生工生物公司测序。

以核桃举肢蛾触角总 RNA 为模板,反转录合成 3′RACE 所需模板。根据 *AhetPBP2* 的 cDNA 片段设计 3′RACE 特异性引物,以 AhGSP1 和 LUPM 为引物进行扩增,3′RACE 反应体系:10 × PCR Buffer(Mg²⁺ free)2.5 μL, MgCl₂ (25 mmol/L)2 μL, dNTP Mix (各 2.5 mmol/L)2 μL, 上游引物 AhGSP1 (10 μmol/L) 1 μL, 下游引物 LUPM (10 μmol/L)1 μL, cDNA 模板 1 μL, Taq 酶(5 U/μL)0.2 μL, dd H₂O 补足至 25 μL。PCR 扩增条件:94℃ 预变性 5 min; 94℃ 40 s, 57℃ 1 min, 72℃ 1 min, 36 个循环; 72℃ 延伸 15 min。

5′RACE 模板根据罗聪等(2011)所述方法合成,以 AhGSP2 和 AUPL 为引物进行扩增,5′RACE 反应体系:10 × PCR Buffer(Mg²⁺ free)2.5 μL, MgCl₂ (25 mmol/L)2 μL, dNTP Mix (各 2.5 mmol/L)2 μL, 上游引物 AhGSP2 (10 μmol/L) 1 μL, 下游引物 AUPL (10 μmol/L)1 μL, cDNA 模板 1 μL, Taq 酶 (5 U/μL)0.2 μL, dd H₂O 补足至 25 μL。PCR 扩增条件:94℃ 预变性 5 min; 94℃ 40 s, 56℃ 1 min, 72℃ 1 min, 36 个循环; 72℃ 延伸 15 min。RACE 所得 PCR 产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测,切胶回收目的片段连接 pMD-19T 克隆载体,并转化于 TG1 感受态细胞中,挑选阳性克隆菌于含氨苄的 LB 液体培养基中 37℃ 200 r/min 过夜培养,将菌液送

上海生工生物公司测序。

将 RACE 检测结果进行拼接,并设计 *AhetPBP2* 开放阅读框全长扩增引物 AhPBPF 和 AhPBPR,以 cDNA 为模板,PCR 反应体系:10 × PCR Buffer(Mg²⁺ free)2.5 μL, MgCl₂ (25 mmol/L)2 μL, dNTP Mix (各 2.5 mmol/L)2 μL, 上游引物 AhPBPF (10 μmol/L) 1 μL, 下游引物 AhPBPR (10 μmol/L)1 μL, cDNA 模板适量, Taq 酶 (5 U/μL) 0.2 μL, ddH₂O 补足至 25 μL。PCR 扩增条件:94℃ 预变性 5 min; 94℃ 40 s, 57℃ 1 min, 72℃ 1 min, 35 个循环; 72℃ 延伸 10 min。PCR 产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测,切胶回收目的片段连接 pMD-19T 克隆载体,并转化于 TG1 感受态细胞中,挑选阳性克隆菌于含氨苄的 LB 液体培养基中 37℃ 200 r/min 过夜培养,将菌液送上海生工生物公司测序。

使用 DNAMAN (Version 6.0) 软件拼接测序结果,查找开放阅读框;利用 ProtParam 在线软件 (<http://web.expasy.org/protparam/>) 预测编码蛋白的分子量与等电点;使用 SignalP 在线软件分析 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 查找信号肽。氨基酸序列比对使用 Clustalx 软件进行;系统发育树使用 MEGA5.0 软件构建,采用邻接法、重复运算 1 000 次。

1.6 *AhetPBP2* 的原核表达、纯化及 Western blot 检测

为增加重组蛋白可溶性表达,设计去信号肽引物进行 PCR 扩增,反应体系:10 × PCR Buffer(Mg²⁺ free)2.5 μL, MgCl₂ (25 mmol/L)2 μL, dNTP Mix (各 2.5 mmol/L)2 μL, 上游引物 AhPBPF2 (10 μmol/L) 1 μL, 下游引物 AhPBPR2 (10 μmol/L)1 μL, cDNA

模板适量,Taq 酶(5 U/ μ L)0.2 μ L,dd H₂O 补足至 25 μ L。PCR 扩增条件:94℃ 预变性 5 min;94℃ 40 s,57℃ 1 min,72℃ 1 min,35 个循环;72℃ 延伸 10 min。将纯化回收的片段连接于 pEASY-E1 表达载体,并转化于 DE3 表达菌中。挑选阳性克隆菌于含氨苄的 LB 液体培养基中 37℃ 200 r/min 过夜培养。取适量菌液按 1:100(v/v)接种于含氨苄的 LB 液体培养基,当 OD₆₀₀ 为 0.5 时,加入 IPTG 使其终浓度为 1 mmol/L,于 28℃ 200 r/min 诱导表达 10 h。诱导结束后,室温离心收集菌体,PBS 悬浮菌体后用超声波破碎仪破碎,并于 4℃ 下 12 000 r/min 离心 10 min。分别收集上清、沉淀和破碎前的悬浮液,用 SDS-PAGE 电泳分析蛋白在上清和沉淀中的表达情况。

用 0.45 μ m 孔径滤器去除蛋白上清中杂质后加入准备好的镍柱中,并用 20,40 和 60 mmol/L 的咪唑洗脱目的蛋白,样品进行 SDS-PAGE 电泳,保留条带单一且蛋白含量较高的样品。

为进一步确定重组表达菌是否正确表达目的蛋白,利用重组蛋白带有组氨酸标签这一特性进行 Western blot 验证。样品经 SDS-PAGE 电泳后采用半干法转移到 NC 膜(硝酸纤维素膜)上,用含 5% 脱脂奶粉的 PBST 4℃ 过夜封闭,以 1:5 000 稀释 HRP-conjugated 6*His-tag 抗体,室温孵育 2 h,化学发光液显色。

1.7 多克隆抗体制备及效价检测

纯化的重组蛋白经透析后与弗氏佐剂充分乳化,对雄性新西兰大白兔进行皮下注射,首次注射弗氏完全佐剂乳化蛋白,后 4 次注射弗氏不完全佐剂乳化蛋白,每次注射间隔一周,免疫完成后取血清于 -80℃ 保存备用,在动物免疫前取血作阴性对照。

将纯化的重组蛋白包被于酶联板,以免疫后兔血清为一抗,未免疫兔血清作为阴性对照,辣根过氧化物酶偶联羊抗兔 IgG 为二抗,采用 ELISA 间接法测定多克隆抗体效价。

1.8 免疫荧光定位

选取羽化后 3~4 d 的成虫触角,将其放入装有 ZnFA(0.25% ZnCl₂,1% 甲醛,135 mmol/L NaCl,1.2% 蔗糖,0.03% Triton X-100)的 PCR 管中,室温固定 16~24 h 后用 HBS(150 mmol/L NaCl,5 mmol/L KCl,25 mmol/L 蔗糖,10 mmol/L Hepes,5 mmol/L CaCl₂,0.03% Triton X-100)清洗 2 次,每次 15 min;将触角置于甲醛与二甲基亚砷 4:1(v/v)的混合液中,室温孵育 1 h 后用含有 0.1 mol/L Tris

和 0.03% Triton X-100 的溶液浸泡触角 5 min,浸泡后用封闭液(含 5% 牛血清蛋白,1% 二甲基亚砷和 0.03% Triton X-100 的 PBS)室温封闭 3 h;经过封闭处理的触角置于含有免疫后兔血清的封闭液中[用封闭液以 1:500(v/v)稀释],4℃ 孵育触角 4 d,期间每日用超声波清洗机震荡 40 s,未经免疫的兔血清作为阴性对照;室温下用 PBS(含 1% 二甲基亚砷和 0.03% Triton X-100)清洗触角 3 次,每次 15 min,加入偶联有荧光素的二抗[用封闭液以 1:1 000(v/v)稀释],4℃ 孵育触角 3 d,期间每日用超声波清洗机震荡 30 s;免疫完成后用 PBS 洗涤,于倒置荧光显微镜下进行观察。

2 结果

2.1 核桃举肢蛾 *PBP2* 全长 cDNA 序列的获得及序列分析

PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测并进行测序,结果显示扩增得到 *AhetPBP2* 基因的 cDNA 片段为 305 bp(图 1),3'RACE 及 5'RACE 扩增产物分别为 534 bp 和 452 bp。将 RACE 测序结果进行拼接,经 DNAMAN (Version 6.0) 软件分析(图 2),*AhetPBP2* 的 cDNA 序列全长为 923 bp,其中 3'端非编码区为 396 bp,末端具有真核生物典型的 poly(A)结构,并且该 poly(A)结构上游 13 bp 处有一个加尾信号(序列为 AATAAA),5'端非编码区为 23 bp,*AhetPBP2* 开放阅读框全长 504 bp,共编码 167 个氨基酸,与扩增产物(图 1)测序结果一致。将

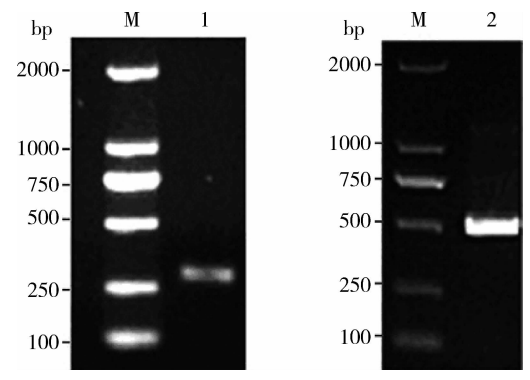


图 1 核桃举肢蛾 *PBP2* 基因 cDNA 片段扩增结果(A)和开放阅读框全长扩增结果(B)
Fig. 1 Amplification result of the cDNA segment (A) and open reading frame (B) of *PBP2* from *Atrijuglans hetaohei* (*AhetPBP2*)
M: DNA 分子量标准 DNA marker; 1: 核桃举肢蛾 *PBP2* cDNA 片段 cDNA segment of *AhetPBP2*; 2: 核桃举肢蛾 *PBP2* 开放阅读框扩增产物 Amplification product of *AhetPBP2* open reading frame.

AhetPBP2 开放阅读框所推导的氨基酸序列与选取的 5 种已知鳞翅目昆虫 PBP 进行比对,结果(图 3)显示,其序列含有 6 个半胱氨酸保守位点,具有 OBP 蛋白家族的典型特征,且氨基酸序列一致性在 63% ~ 67% 之间,证实其开放阅读框编码核桃举肢蛾性信息素结合蛋白。

将 *AhetPBP2* 开放阅读框所推导的氨基酸序列与已知的 15 种鳞翅目昆虫的 27 个 PBP 联配并构建系统发育树(图 4),所选取的鳞翅目昆虫 PBP 形成了 3 个明显的类群,从上到下分别由 PBP2, PBP3 及 PBP1 所组成。核桃举肢蛾 PBP2 位于由其他蛾类 PBP2 所组成的类群中,与该类群中的其他 9 个 PBP 氨基酸序列一致性在 43.6% ~ 64.7% 之间,与苹果蠹蛾 *Cydia pomonella* 的 *CpomPBP2* 氨基酸序列一致性最高(为 64.7%),证实其属于 PBP 亚类,命名为 *AhetPBP2*,并在 GenBank 上注册,登录号为 KP723853。

利用 ProtParam 在线软件对 *AhetPBP2* 所推导的氨基酸序列进行分析,预测分子量为 19.26 kD,等

电点为 5.47。经 SignalP 在线软件预测,*AhetPBP2* 的 N-端前 24 个氨基酸为信号肽,*AhetPBP2* 成熟蛋白包括 143 个氨基酸,预测分子量为 16.66 kD,等电点为 5.20。

2.2 *AhetPBP2* 的原核表达、纯化及 Western blot 检测

将回收的诱导表达菌悬浮液、沉淀、上清及纯化后蛋白经 15% SDS-PAGE 检测,未经诱导表达的菌作为对照,其结果(图 5)显示第 2, 4 和 5 泳道 17 kD 处有明显的目的条带,且与理论值相符。

Western blot 检测结果(图 6)显示,在 17 kD 处经诱导的 pEASY-E1-*AhetPBP2* 表达菌及纯化后的重组蛋白均有明显的特异性免疫反应,而未诱导的 pEASY-E1-*AhetPBP2* 表达菌、经诱导的 pEASY-E1 (+) 表达菌及未诱导的 BL21 (DE3) 均无显色,证明重组蛋白诱导表达成功。

2.3 多克隆抗体效价检测结果

将纯化后的重组蛋白作为抗原,用 ELISA 间接法测定效价。兔血清第一次稀释 1 000 倍,以后采用

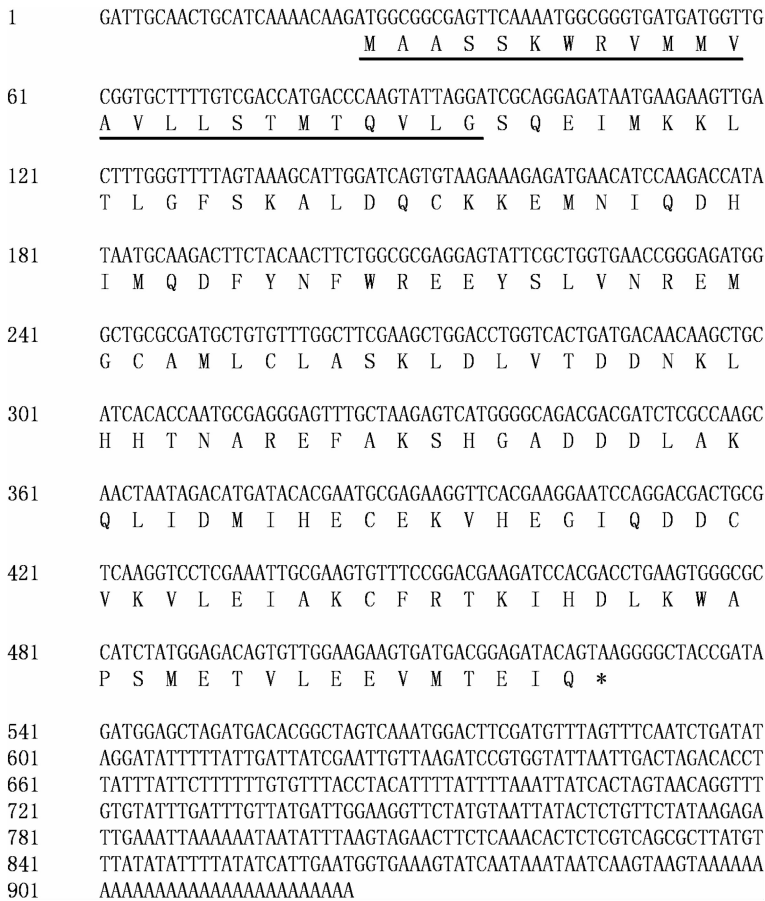


图 2 *AhetPBP2* 核苷酸和氨基酸序列

Fig. 2 Nucleotide and deduced amino acid sequences of *AhetPBP2*

星号代表终止密码子,下划线标示信号肽序列。The asterisk indicates the stop codon, and the signal peptide sequence is shown by underline.

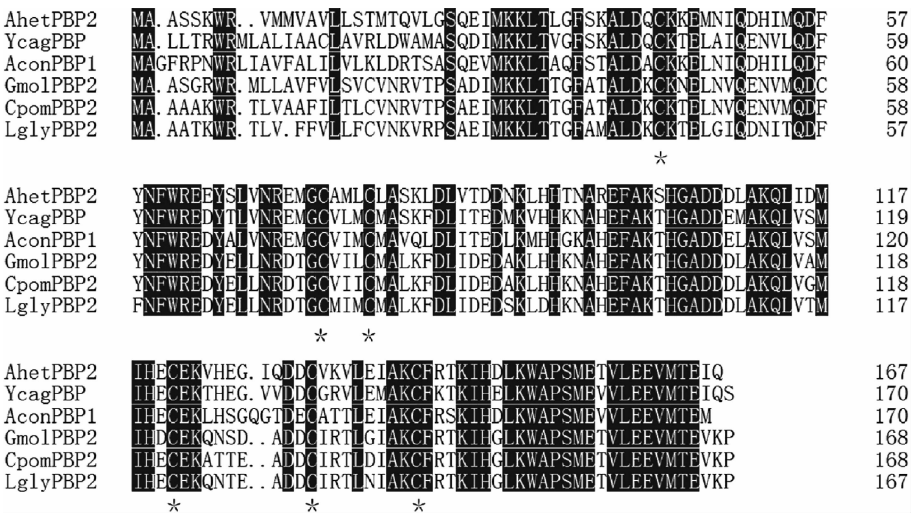


图 3 AhetPBP2 与其他鳞翅目昆虫 PBP2s 氨基酸序列比对

Fig. 3 Amino acid sequence alignment of AhetPBP2 with the PBP2s from other lepidopteran species

其他物种 PBP2s 的来源及其基因登录号 GenBank accession numbers of the PBP2s from other species; YcagPBP: 巢蛾 *Yponomeuta cagnagellus*, AAF06143; AconPBP1: 苹果银蛾 *Argyresthia conjugella*, AFD34176; GmolPBP2: 梨小食心虫 *Grapholita molesta*, AHZ89398; CpomPBP2: 苹果蠹蛾 *Cydia pomonella*, AFL91693; LglyPBP2: 大豆食心虫 *Leguminivora glycinivorella*, AEO91540. 星号代表保守的半胱氨酸位点。The asterisk indicates the position of the conserved cysteine residues.

用倍比稀释法,当稀释到 $1\ 024 \times 10^3$ 倍时,待检测血清的 OD 值明显大于阴性对照 OD 值的 2 倍,而且阴性对照无明显变化,表明多克隆抗体具有良好的免疫活性,满足免疫组化分析要求。

2.4 重组蛋白的免疫荧光定位

将免疫处理后的成虫触角置于倒置荧光显微镜下观察,结果(图 7)显示未免疫兔血清作为一抗的阴性对照组未检测出明显的荧光信号。以免疫后兔血清作为一抗的实验组,成虫触角部分感器检测出较强的荧光信号,表明该部分感器被 AhetPBP2 抗体标记,由此推测被标记的感器中可能存在 AhetPBP2,具有感受性信息素的功能。

3 讨论

本研究提取了羽化后 3-4 d 的核桃举肢蛾成虫触角总 RNA 并反转录合成 cDNA,设计简并引物进行 RT-PCR 获得了 cDNA 片段,然后设计特异性引物进行 RACE 扩增,获得了 AhetPBP2 全长 cDNA 序列,大小为 923 bp,开放阅读框序列为 504 bp,成熟蛋白包括 143 个氨基酸,理论分子量为 16.66 kD,等电点为 5.20。将 AhetPBP2 开放阅读框所推导氨基酸序列与 5 种鳞翅目昆虫 PBP2s 进行多重序列比对,氨基酸序列一致度在 63%~67% 这间,并且发现其含有 6 个保守半胱氨酸残基位点,具有

OBPs 蛋白家族的典型特征,与 15 种鳞翅目昆虫的 27 个 PBP2s 联配并构建系统发育树,发现其位于由鳞翅目昆虫 PBP2 所组成的类群中,属于 PBP2s 亚类,因此命名为 AhetPBP2。本试验进行了 AhetPBP2 基因的原核表达,经终浓度 1 mmol/L IPTG 诱导 10 h 可获得大量可溶性重组蛋白。经纯化的重组蛋白免疫新西兰大白兔成功制备多克隆抗体,效价为 1:1 024 000。用制备的多克隆抗体作为一抗对核桃举肢蛾触角进行免疫组化分析,发现核桃举肢蛾触角部分感器被抗体标记。由此,我们推测该部分感器具有感受性信息素的功能。昆虫一般具有 3 种或 3 种以上的 PBP2s,并且它们之间具有一定的氨基酸序列一致性(Xiu *et al.*, 2008)。多克隆抗体用于组织免疫定位研究,对抗原有良好的特异性,但仍不能避免对相似度较高蛋白的非特异性识别。在对小地老虎 *Agrotis ipsilon* 3 种 PBP2s 的研究中发现,AipsPBP1 抗体与 AipsPBP3 也能够发生免疫反应,说明 AipsPBP1 抗体的特异性不足以区分 AipsPBP1 和 AipsPBP3(Gu *et al.*, 2013)。核桃举肢蛾 PBP2s 是否存在类似情况,仍有待其他种类核桃举肢蛾 PBP2s 的发现并加以验证。

PBP2s 作为 OBPs 的一个亚家族,普遍存在于昆虫体内,分子量通常小于 20 kD(Pelosi and Maida, 1995),而预测的 AhetPBP2 理论分子量为 19.26 kD,成熟蛋白为 16.66 kD,符合以往研究所得出的结论。PBP2s 主要分布于昆虫触角嗅觉感器的淋巴

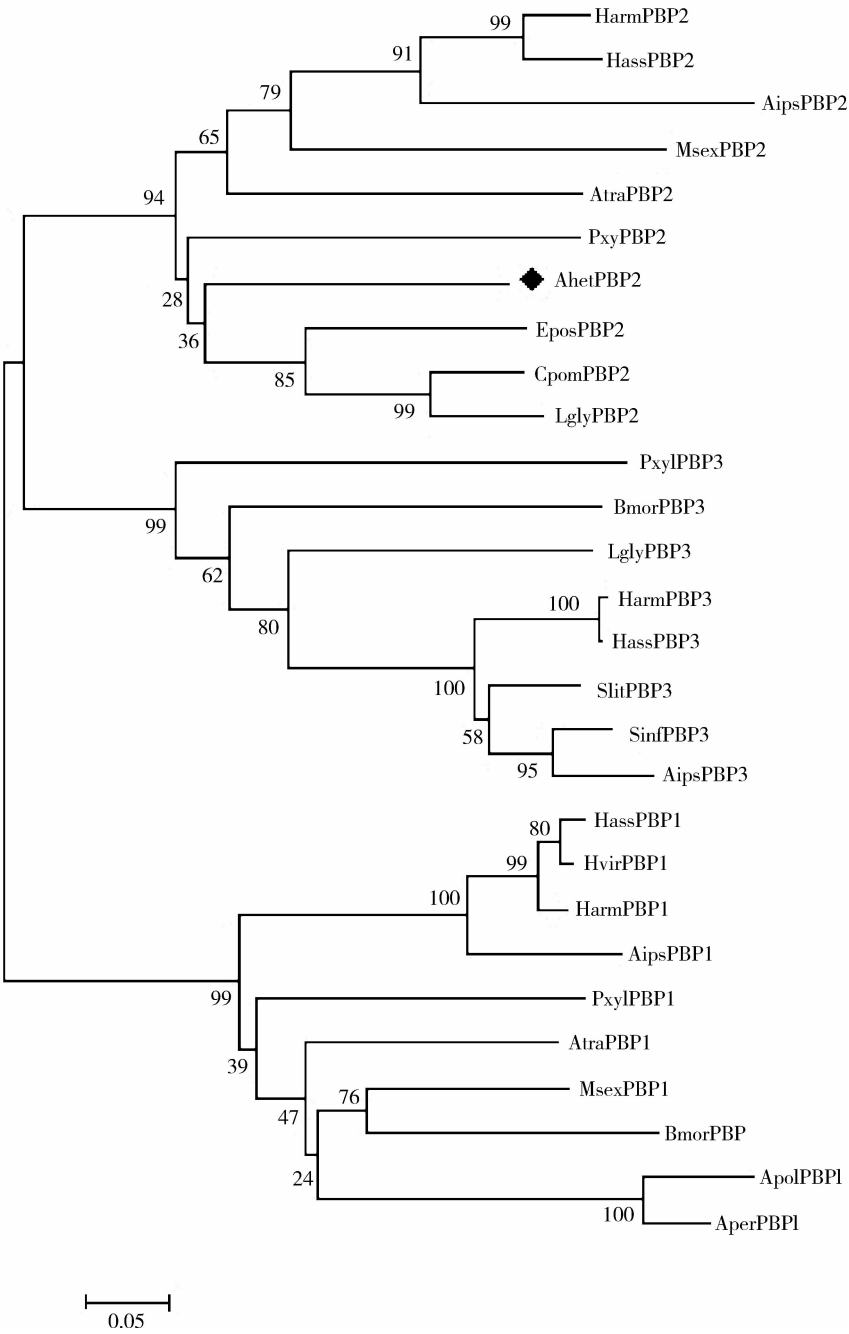


图4 基于氨基酸序列的核桃举肢蛾 PBP2 系统发育树的构建(邻接法)

Fig. 4 Phylogenetic analysis of AhetPBP2 based on amino acid sequence (neighbor-joining method)

其他物种 PBP 的来源及其 GenBank 登录号 The GenBank accession numbers of the PBPs from other species; AperPBP1: 柞蚕 *Antheraea pernyi*, X96773; ApolPBP1: 多音大蚕蛾 *Antheraea polyphemus*, X17559; BmorPBP: 家蚕 *Bombyx mori*, X94987; BmorPBP3: 家蚕 *Bombyx mori*, AM403101; MsexPBP1: 烟草天蛾 *Manduca sexta*, AF117593; MsexPBP2: 烟草天蛾 *Manduca sexta*, AAF16710; MsexPBP3: 烟草天蛾 *Manduca sexta*, AF117581; AipsPBP1: 小地老虎 *Agrotis ipsilon*, AFM36756; AipsPBP2: 小地老虎 *Agrotis ipsilon*, AFM36757; AipsPBP3: 小地老虎 *Agrotis ipsilon*, AFM36758; HarmPBP1: 棉铃虫 *Helicoverpa armigera*, AJ278992; HarmPBP2: 棉铃虫 *Helicoverpa armigera*, EU647241; HarmPBP3: 棉铃虫 *Helicoverpa armigera*, AF527054; HassPBP1: 烟实夜蛾 *Helicoverpa assulta*, AY864775; HassPBP2: 烟实夜蛾 *Helicoverpa assulta*, GU170398; HassPBP3: 烟实夜蛾 *Helicoverpa assulta*, DQ286414; HvirPBP1: 烟芽夜蛾 *Heliothis virescens*, X96861; SinfPBP3: 大螟 *Sesamia inferens*, AEQ30020; AtraPBP1: 脐橙螟 *Amyelois transitella*, GQ433364; AtraPBP2: 脐橙螟 *Amyelois transitella*, ACX47892; EposPBP2: 苹淡褐卷叶蛾 *Epiphyas postvittana*, AF411459; LglyPBP2: 大豆食心虫 *Leguminivora glycinivorella*, AEO91540; CpomPBP2: 苹果蠹蛾 *Cydia pomonella*, AFL91693; PxyIPBP1: 小菜蛾 *Plutella xylostella*, BAG71422; PxyIPBP2: 小菜蛾 *Plutella xylostella*, AGH13203; PxyIPBP3: 小菜蛾 *Plutella xylostella*, FJ201994; SliIPBP3: 斜纹夜蛾 *Spodoptera litura*, ACY78414. 标尺示遗传距离。The scale bar indicates the genetic distance.

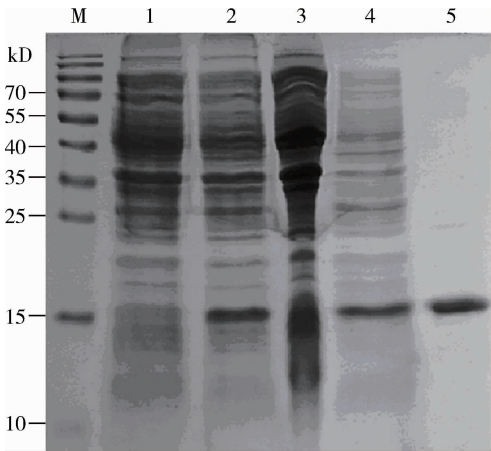


图 5 SDS-PAGE 分析 *AhetPBP2* 基因的原核表达
Fig. 5 Prokaryotic expression of *AhetPBP2* gene analyzed by SDS-PAGE

M: 蛋白标记物 Protein marker; 1: 未诱导的 pEASY-E1-*AhetPBP2* 菌体表达蛋白上清 Supernatant of *Escherichia coli* BL21 (DE3) carrying pEASY-E1-*AhetPBP2* without induction with IPTG; 2: 经 1 mmol/L IPTG 诱导的 pEASY-E1-*AhetPBP2* 菌体表达蛋白上清 Supernatant of *E. coli* BL21 (DE3) carrying pEASY-E1-*AhetPBP2* after induction with 1 mmol/L IPTG; 3: 经 1 mmol/L IPTG 诱导的 pEASY-E1-*AhetPBP2* 菌体表达蛋白包涵体 Inclusion body of *E. coli* BL21 (DE3) carrying pEASY-E1-*AhetPBP2* after induction with 1 mmol/L IPTG; 4: 经 1 mmol/L IPTG 诱导的 pEASY-E1-*AhetPBP2* 菌体表达蛋白上清 Supernatant of *E. coli* BL21 (DE3) carrying pEASY-E1-*AhetPBP2* after induction with 1 mmol/L IPTG; 5: 经纯化的重组蛋白 Purified recombinant protein.

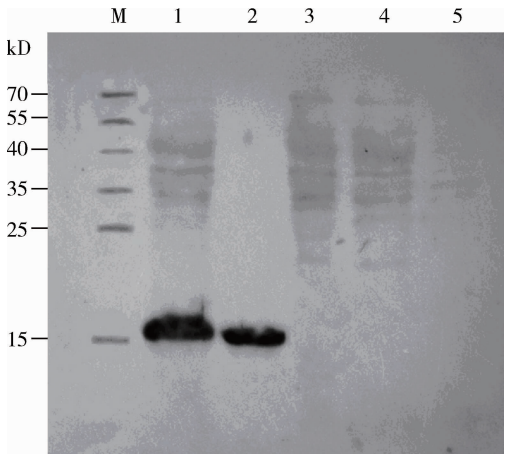


图 6 重组蛋白 *AhetPBP2* 的 Western blot 检测结果
Fig. 6 Western blot analysis of recombinant *AhetPBP2*

M: 蛋白标记物 Protein marker; 1: 经 1 mmol/L IPTG 诱导的 pEASY-E1-*AhetPBP2* 菌体表达蛋白上清 Supernatant of *E. coli* BL21 (DE3) carrying pEASY-E1-*AhetPBP2* after induction with 1 mmol/L IPTG; 2: 经纯化的重组蛋白 Purified recombinant protein; 3: 未诱导的 pEASY-E1-*AhetPBP2* 菌体表达蛋白上清 Supernatant of *E. coli* BL21 (DE3) carrying pEASY-E1-*AhetPBP2* without induction with IPTG; 4: 经 1 mmol/L IPTG 诱导的 pEASY-E1 (+) 菌体表达蛋白上清 Supernatant of *E. coli* BL21 (DE3) carrying pEASY-E1 (+) after induction with 1 mmol/L IPTG; 5: 未诱导的 BL21 (DE3) 菌体表达蛋白上清 Supernatant of *E. coli* BL21 (DE3) without induction.

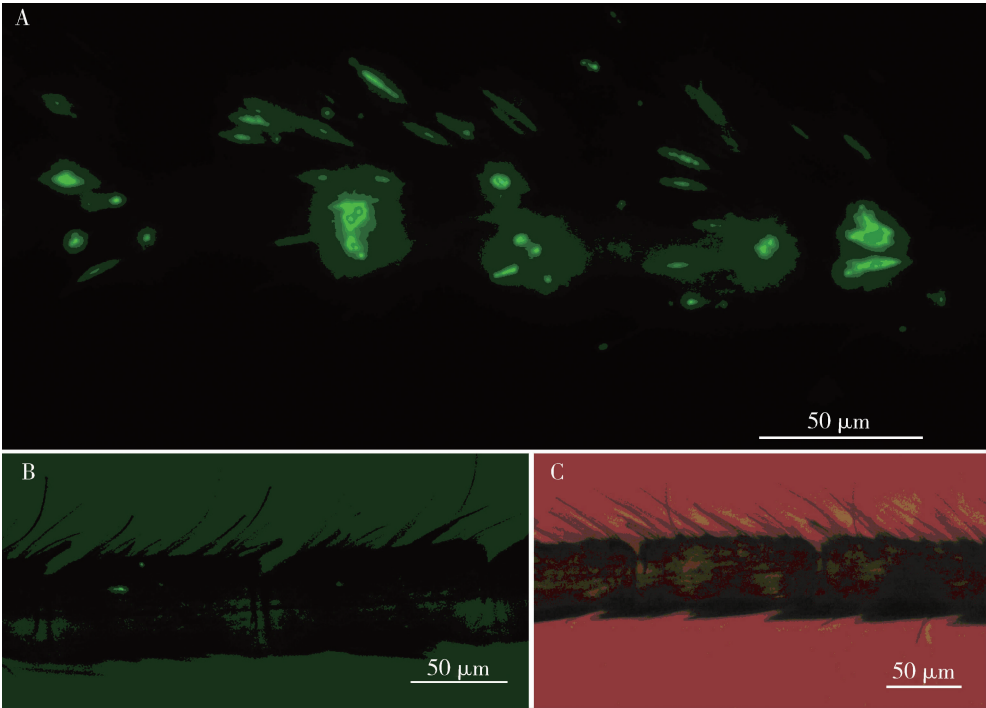


图 7 核桃举肢蛾成虫触角上 *AhetPBP2* 的免疫荧光定位

Fig. 7 Immunofluorescence localization of *AhetPBP2* on the antenna of *Atrijuglans hetaohei* adults

A. 核桃举肢蛾成虫触角中 *AhetPBP2* 的免疫荧光定位。以多克隆抗体作为一抗、偶联有荧光素的羊抗兔抗体为二抗免疫举肢蛾成虫触角 Immunofluorescence localization of *AhetPBP2* on the antenna of *A. hetaohei*. Antenna was immunized by polyclonal antibody specific for *AhetPBP2*. Immunoreactivity was visualized by an Alexa488 secondary antibody. B: 阴性对照 (未免疫) Negative control (not immunized). C: A 图中触角在可见光源下观察结果 Observation corresponding to the antenna of Fig. A under visible light.

液内,作用是与雌虫释放的性信息素发生结合,携带信息素通过血淋巴,到达感觉神经元树突膜,并激活位于膜上的气味受体(Prestwich *et al.*, 1995)。以往研究认为 PBP 分布于昆虫的毛形感器淋巴液内,然而在对小地老虎 PBP 研究中发现,其 3 种 PBP 除分布于毛形感器中,锥形感器中也有少量存在(Gu *et al.*, 2013)。昆虫触角的毛形感器具有多种类型,对信息素不同组分的识别也具有差异性,小地老虎的长毛形感器特异性的识别主要信息素组分,短毛型感器能够同时对 3 种性信息素组分产生反应(Renou *et al.*, 1996)。Forstner 等(2009)通过对多音大蚕蛾的 ApolOR1 及 ApolPBPs 进行双重原位杂交,发现 ApolOR1 表达细胞被 ApolPBP1, ApolPBP2 和 ApolPBP3 的表达细胞包围,因此,这 3 种蛋白可能参与了对性信息素的运输和激活 ApolOR1,进一步的钙离子成像试验结果显示,在信息素浓度较低时,只有 ApolPBP2 与 (*E*, *Z*)-6, 11-hexadecadienal 的复合体对 ApolOR1 有激活作用,而高浓度信息素情况下,ApolOR1 的激活被 3 种 PBP 共同调节。本研究对 *AhetPBP2* 进行了原核表达,并利用多克隆抗体探究了其在核桃举肢蛾触角中的可能分布,为后续研究核桃举肢蛾性信息素与 *AhetPBP2* 结合特性提供了材料,也为进一步研究 *AhetPBP2* 在不同感器中的分布及与不同气味受体的共表达模式奠定了基础。

参考文献 (References)

- Briand L, Spoulous C, Huet JC, Pernollet JC, 2001. Disulfide pairing and secondary structure of ASP₁, an olfactory-binding protein from honeybee (*Apis mellifera* L.). *J. Pep. Res.*, 58(6): 540–545.
- Du J, Liu YF, Tan SQ, Wu JX, 2013. Control index based on number of adults of *Grapholita molesta* captured by sex pheromone traps. *Acta Phytophylacica Sinica*, 40(2): 140–144. [杜娟, 刘彦飞, 谭树乾, 仵均祥, 2013. 基于性诱剂监测的梨小食心虫防治指标. 植物保护学报, 40(2): 140–144]
- Forstner M, Breer H, Krieger J, 2009. A receptor and binding protein interplay in the detection of a distinct pheromone component in the silkworm *Antheraea polyphemus*. *Int. J. Biol. Sci.*, 5(7): 745–757.
- Gu SH, Zhou JJ, Wang GR, Zhang YJ, Guo YY, 2013. Sex pheromone recognition and immunolocalization of three pheromone binding proteins in the black cutworm moth *Agrotis ipsilon*. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 43(3): 237–251.
- Hansson BS, 1995. Olfaction in Lepidoptera. *Experientia*, 51(11): 1003–1027.
- Hao XY, Zhang JT, Wang R, Cao TW, 2005. Scanning electron microscopic observation of sex pheromone communication system in *Atrijuglans hetaohei* Yang. *Journal of Shanxi Agricultural University (Natural Science Edition)*, 25(4): 353–354. [郝兴宇, 张金桐, 王瑞, 曹天文, 2005. 核桃举肢蛾性信息素通讯系统扫描电镜观察. 山西农业大学学报(自然科学版), 25(4): 353–354]
- Hao XY, Zhang JT, Wang R, Cao TW, Li YL, 2007. Component analysis of the sex pheromone gland secretion for *Atrijuglans hetaohei* Yang. *Journal of Shanxi Agricultural University (Natural Science Edition)*, 27(4): 409–411. [郝兴宇, 张金桐, 王瑞, 曹天文, 李咏玲, 2007. 核桃举肢蛾性信息素腺体提取物的成分分析. 山西农业大学学报(自然科学版), 27(4): 409–411]
- Hao XY, Zhang JT, Wang R, Li YL, Cao TW, 2008. Synthesis and field tests of sex attractant for *Atrijuglans hetaohei* Yang. *Journal of Shanxi Agricultural University (Natural Science Edition)*, 28(3): 303–304, 307. [郝兴宇, 张金桐, 王瑞, 李咏玲, 曹天文, 2008. 核桃举肢蛾性诱剂的合成与田间诱蛾活性试验. 山西农业大学学报(自然科学版), 28(3): 303–304, 307]
- Leal WS, Nikonova L, Peng GH, 1999. Disulfide structure of the pheromone binding protein from the silkworm moth, *Bombyx mori*. *FEBS Letters*, 464: 85–90.
- Luo C, He XH, Chen H, Wei YL, Li MJ, 2011. A high-efficient method of RACE technique for obtaining the gene 5' end. *Plant Physiology Journal*, 47(4): 409–414. [罗聪, 何新华, 陈虎, 韦泳丽, 李明娟, 2011. 一种高效获取基因 5'末端的 RACE 方法. 植物生理学报, 47(4): 409–414]
- Pelosi P, Maida R, 1995. Odorant-binding proteins in insects. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.*, 111(3): 503–514.
- Prestwich GD, Du GH, Laforest S, 1995. How is pheromone specificity encoded in proteins. *Chemical Senses*, 20(4): 461–469.
- Renou M, Gadenne C, Tauban D, 1996. Electrophysiological investigations of pheromone-sensitive sensilla in the hybrids between two moth species. *J. Insect Physiol.*, 42(3): 267–277.
- Schneider D, 1992. 100 years of pheromone research: an essay on Lepidoptera. *Naturwissenschaften*, 79(6): 241–250.
- Steinbrecht RA, Laue M, Ziegelberger G, 1995. Immunolocalization of pheromone-binding protein and general odorant-binding protein in olfactory sensilla of the silk moths *Antheraea* and *Bombyx*. *Cell Tissue Res.*, 282(2): 203–217.
- Steinbrecht RA, Ozaki M, Ziegelberger G, 1992. Immunocytochemical localization of pheromone-binding protein in moth antennae. *Cell Tissue Res.*, 270(2): 287–302.
- Vogt RG, Callahan FE, Rogers ME, Dickens JC, 1999. Odorant binding protein diversity and distribution among the insect orders, as indicated by LAP, an OBP-related protein of the true bug *Lygus lineolaris* (Hemiptera, Heteroptera). *Chemical Senses*, 24(5): 481–495.
- Vogt RG, Riddiford LM, 1981. Pheromone binding and inactivation by moth antennae. *Nature*, 293: 161–163.
- Vogt RG, Rogers ME, Franco MD, Sun M, 2002. A comparative study of odorant binding protein genes: differential expression of the PBP1-GOBP2 gene cluster in *Manduca sexta* (Lepidoptera) and the organization of OBP genes in *Drosophila melanogaster* (Diptera). *J. Exp. Biol.*, 205(6): 719–744.
- Xiu WM, Dong SL, Wang YC, 2005. Pheromone binding proteins in insects with emphasis on their molecular transport and physiological functions. *Acta Entomologica Sinica*, 48(5): 778–784. [修伟明, 董双林, 王荫长, 2005. 昆虫性信息素结合蛋白及其分子运输机制和生理功能研究进展. 昆虫学报, 48(5): 778–784]
- Xiu WM, Zhou YZ, Dong SL, 2008. Molecular characterization and expression pattern of two pheromone-binding proteins from *Spodoptera litura* (Fabricius). *J. Chem. Ecol.*, 34: 487–498.

(责任编辑: 袁德成)